

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-056366

(43)Date of publication of application : 02.03.1999

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
C12Q 1/68

(21)Application number : 09-225567

(71)Applicant : ASAHI BREWERIES LTD

(22)Date of filing : 08.08.1997

(72)Inventor : YAMAGISHI HIROMI  
OTSUTA YUKI  
OGATA TOMOO  
FUNABASHI WATARU

## (54) IDENTIFICATION OF YEAST

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To carry out identification whether a yeast is a yeast for brewing or a yeast for non-brewing and is a yeast belonging to the genus *Saccharomyces* or a yeast belonging to another genus, by utilizing a polymerase chain reaction and a restriction fragment length polymorphism.

SOLUTION: A primer so as to amplify a part of FLO1 gene of a yeast of the genus *Saccharomyces* is synthesized and the yeast of the genus *Saccharomyces* is identified whether it is a yeast except the genus *Saccharomyces* by the amplification result by PCR method. A primer prepared so as to amplify a part of rDNA is synthesized and a yeast is identified whether it is a yeast for brewing or a yeast except the yeast by utilizing a restriction fragment length polymorphism for comparing fragments obtained by amplified by PCR method with restriction enzymes.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-56366

(43)公開日 平成11年(1999)3月2日

(51)Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	FI	
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 N 15/00	ZNAA
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数 2 FD (全 5 頁)

(21)出願番号	特願平9-225567	(71)出願人	000000055 アサヒビール株式会社 東京都中央区京橋3丁目7番1号
(22)出願日	平成9年(1997)8月8日	(72)発明者	山岸 裕美 東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビ ール株式会社酒類研究所内
		(72)発明者	大篇 由紀 東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビ ール株式会社酒類研究所内
		(72)発明者	尾形 智夫 東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビ ール株式会社酒類研究所内
		(74)代理人	弁理士 舟橋 榮子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 酵母を同定する方法

(57)【要約】

【課題】 醸造用酵母と非醸造用酵母を区別し同定する方法を提供する。

【解決手段】 サッカロマイセス属酵母のFLO1遺伝子の一部を増幅するように作製したプライマーを合成しPCR法を利用して酵母を同定する方法と、rDNAの一部を増幅するように作製したプライマーを合成し、PCR法とRFLPを利用して酵母を同定する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 サッカロマイセス属酵母のFL01遺伝子の一部を増幅するように作成したプライマーを合成しPCR法を実施して酵母を分類する工程と、rDNA遺伝子の一部を増幅するように作成したプライマーを合成してPCR法を実施し、さらに制限酵素断片長多型性を利用して分類する工程とを組み合わせる酵母を同定する方法。

【請求項 2】 FL01遺伝子の一部を増幅するように作成したプライマーが次の配列

5'-CCAAAAATGACAATGCCTCATCGCTAT-3'

5'-CCATTGCTAGGATAGAATGGGTAATAATTGGACG-3'

である請求項 1 に記載の酵母を同定する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、醸造用酵母か非醸造用酵母か、またサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属酵母か他の属の酵母かをの同定を、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction 法 (以下、PCR 法という)) と制限酵素切断長多型性 (Restriction Fragment Length Polymorphism (以下、RFLP という)) を利用して行う方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 ビール醸造では、醸造用酵母を非醸造用酵母と明確に区別することは、発酵特性や全体的な製品特性を保つために重要である。例えば、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、ブレタノマイセス (*Brettanomyces*) 属、カンジダ (*Candida*) 属、醸造用酵母以外のサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属といった非醸造用酵母が混入すると、ビールの品質が低下し、混濁やオフフレーバーの原因となる。

【0003】 一方、酵母の検出、同定、性格化は、伝統的に生理学的、生化学的、形態学のおこなってきたが、時間がかかる上、不十分で不完全な情報しか得られないことも多い。また、醸造用酵母はサッカロマイセス属であるので、醸造用酵母以外の同属のサッカロマイセス属酵母、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*)、サッカロマイセス・バヤナス (*S. bayanus*)、サッカロマイセス・エリプソイデウス (*S. ellipsoideus*) を表現型にて分離同定することは難しいという問題がある。特に、サッカロマイセス・ジアスタティカス (*S. diastaticus*) は、重大なビール有害酵母であり、確実な検出ができることが大切である。

【0004】 以上のような背景から、サッカロマイセス属の非醸造用酵母と醸造用酵母を分離同定する方法が望まれていた。一方、本発明に関する先行技術としては、FEMS Microbiol. Lett., Vol. 108, p. 259-264, (1993) および J. Am. Soc. Brew. Chem., Vol. 54, p. 97-102, (1996) がある。これらの文献には、酵母の rDNA 遺伝子の一部を PCR 法で増幅し、さらに RFLP を用いて同定する方法が開示されている。しかし、これらの方法では、酵母

のいくつかの属種について同定はできるものの醸造用酵母と非醸造用酵母とを確実に同定することが可能であったとの報告はない。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明は、従来の酵母の rDNA の一部を増幅することができるプライマーを作成し、PCR 法による増幅物に制限酵素を作用させて生じた断片を比較する RFLP を利用した同定に加えて、醸造用酵母と非醸造用酵母とにおいて違いのある遺伝子の一部をもとにしたプライマーを合成して、PCR 法を実施する酵母の同定法に関する。

【0006】 さらに詳しくは、(1) 醸造用酵母と非醸造用酵母とを区別することが可能である醸造用酵母としての特性を持つ遺伝子の一部を増幅することができる PCR 用のプライマーを作成し、PCR 法による増幅結果からサッカロマイセス属酵母かサッカロマイセス属以外の酵母かを同定する方法と、(2) 酵母の rDNA の一部を増幅することができる PCR 用のプライマーを作成し、PCR 法による増幅物に制限酵素を作用させて生じた断片を比較することによる醸造用酵母かそれ以外の酵母かを同定する方法、を組み合わせることによって効果的に酵母の同定を行えるようにするものである。

## 【0007】

【発明の実施の形態】 さらに、本発明を具体的に説明する。同定しようとする属種が不明確な酵母と同定結果の比較対象となる代表的なサッカロマイセス属醸造用酵母および代表的な非醸造用酵母 (サッカロマイセス属酵母を含む) から、通常の DNA 抽出 (Gene, Vol. 57, p267-272, (1987) 参照) を行う。

【0008】 一方、既に報告されているか、または独自に解析した醸造用酵母と非醸造用酵母の DNA 配列を比較し、醸造用酵母と非醸造用酵母に違いの認められる遺伝子を選択する。例えば、すでに報告がある酵母の凝集性に関係する FL01 遺伝子 (Watari et al., Yeast, Vol. 10 p. 211-225, (1994)) に着目することができる。FL01 遺伝子は、繰り返し配列が多く、遺伝子の多型性が予想されるので、その繰り返し配列部分が PCR 法により増幅できるようにプライマーを合成する。

【0009】 合成したプライマーを抽出した各種酵母の DNA に加え、PCR 法を行う。PCR 法は FEMS Microbiol. Lett., Vol. 108, p. 259-264, (1993) に基づき実施することができる。増幅したものの一部を取り出し、アガロースゲル電気泳動に供する。電気泳動の結果を比較し、同定する酵母の電気泳動パターンがサッカロマイセス属酵母かあるいはサッカロマイセス属以外の酵母のいずれのパターンであるかによって、サッカロマイセス属であるかどうかを判定する。

【0010】 一方、rDNA の一部の増幅を行うプライマーは、独自に合成することができるが、すでに報告されている FEMS Microbiol. Lett., Vol. 108, p. 259-264, (19

93), J. Am. Soc. Brew. Chem., Vol. 54, p. 97-102, (1996)の文献に記載されているプライマーを合成し利用することができる。RFLPに利用する制限酵素も同文献に紹介されているもの、例えば、MspI、ScrFI、BstUI等を利用することができる。

【0011】次に、前記と同様に、抽出した各種酵母のDNAにrDNAの一部を増幅させるプライマーを作用させ、PCR法を行い増幅を行い、アガロースゲル電気泳動に供する。さらにその増幅産物の一部をとり制限酵素を作用させて、アガロース電気泳動に供する。その後、増幅産物あるいは制限酵素処理物の電気泳動の結果を比較し、サッカロマイセス属の中でも醸造用酵母か非醸造用酵母かを電気泳動パターンによって判定することができる。

【0012】以上、2つの方法を実施することにより、同定したい酵母がサッカロマイセス属酵母か否か、さらにサッカロマイセス属においても醸造用酵母であるか否かを判定することが可能である。また、これらのデータをコンピュータ等に蓄積していくことにより、同定したい酵母の実験結果を蓄積データと比較することにより、簡易に識別していくことも出来る。

#### 【0013】

【実施例】以下に実施例を用いて本発明を具体的に説明する。

##### ①酵母のDNAの抽出

サッカロマイセス属の醸造用酵母4株、サッカロマイセス属の非醸造用酵母12株およびサッカロマイセス属以外の非醸造用酵母15株を、それぞれ10mlのYPD培地(1% Yeasts extract, 2% Peptone, 2% Glucose)に定常期まで培養した後、遠心分離により、集菌した。その後、蒸留水で洗浄し、0.2mlの2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 8), 1mM Na<sub>2</sub>EDTAに懸濁した。さらに、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1) 0.2mlおよび酸で洗浄したガラスビーズ0.3gを加え、2分間よく攪拌した後、5分間遠心分離した。水層を分離した後、1mlのエタノールを加え、10分間以上、-20℃に静置した後、再度遠心分離し、沈殿を回収した。得られた沈殿を、0.4 mlのTE (10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA)に溶解させ、10mg/ml Rnase A溶液を3ml 加え、37℃ 30min 加温した後、1mlのエタノールを加え、10分間以上、-20℃に静置し、遠心分離して沈殿を回収した。得られた沈殿を、50 mlのTE (10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA)に溶解させ、このうちの一部を試験に供した。

【0014】②FL01遺伝子の一部を用いたPCR法によるサッカロマイセス属酵母か否かの識別

PCR法に用いるプライマーの部位を決定する、FL01遺伝子を利用した。FL01遺伝子については、Watari らの報告(Yeast, Vol. 10, p. 211-225, (1994))を参考にし

た。このFL01遺伝子の配列の中から、繰り返し配列が多く、遺伝子の多型性が予想される部分を決定し、その部分を増幅できるように次のプライマーを合成した。

5'-CCAAAAATGACAATGCCTCATCGCTAT-3'

5'-CCATTGCTAGGATAGAATGGGGTAATAATTGGACG-3'

PCRの条件は、94℃ 5分間のホットスタートの後、94℃ 2分30秒間、55℃ 45秒間、72℃ 1分30秒間を30サイクル繰り返し、最後に、72℃ 10分間保温した。この一部を取り出し、アガロースゲル電気泳動に供した。

【0015】結果を図1に示した。その結果、サッカロマイセス属以外のハンゼヌラ属、ブレタノマイセス属、カンジダ属にはバンドが認められず、サッカロマイセス属にのみバンドが認められた。また、バンドパターンの特徴によって、サッカロマイセス属の中でも醸造用か非醸造用酵母かの識別もある程度可能であった。

【0016】③ 醸造用サッカロマイセス属酵母か非醸造用サッカロマイセス属酵母かの識別

rDNAの一部を増幅するプライマーは、Molinaらの方法

(FEMS Microbiol. Lett., Vol. 108, p. 259-264, (1993))に従い、次の2つのプライマーを合成した。

5'-CACCGTTTCCCGTCCGATC-3'

5'-CAGAACGCCTCTAAGTC-3'

PCRの条件は、FEMS Microbiol. Lett., Vol. 108, p. 256-264, (1993))を改良しておこなった。すなわち、94℃ 5分間のホットスタートの後、94℃ 2分30秒間、55℃ 1分30秒間、72℃ 3分間を25サイクル繰り返し、最後に72℃ 10分間保温した。

【0017】制限酵素の処理は、PCRの増幅産物の一部をとり、MspIやScrFIで処理することでおこなった。結果を図2～4に示した。その結果、サッカロマイセス属酵母において、醸造用酵母と非醸造用酵母において異なったバンドパターンが認められた。

#### 【0018】

【発明の効果】本発明によれば、醸造用酵母か非醸造用酵母か、またサッカロマイセス属酵母か他の属の酵母かの同定をPCR法およびRFLPを組み合わせることによって効果的に行うことが出来る。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】FL01遺伝子のDNA配列より作製したプライマーによっておこなったPCRの結果の電気泳動図。

【図2】rDNAのDNA配列より作製したプライマーによっておこなったPCRの結果の電気泳動図。

【図3】rDNAのDNA配列より作製したプライマーによっておこなったPCR産物を制限酵素MspIで処理した場合の電気泳動図。

【図4】rDNAのDNA配列より作製したプライマーによっておこなったPCR産物を制限酵素ScrFIで処理した場合の電気泳動図。

【図1】



図1 FLO1 PCR

1, 17, 18:  $\lambda$ -HindIII. 2, 3, 19: 下面酵母. 4: 上面酵母. 5: *S. bayanus* ATCC12752. 6: *S. bayanus* IF00539. 7: *S. bayanus* IF00613. 8: *S. bayanus* IF00676. 9: *S. bayanus* IF01127. 10: *S. legos* ATCC10603. 11: *S. legos* IF01229. 12: *S. legos* NCYC100. 13: *S. williamsii* IF00248. 14: *S. williamsii* IF00814. 15: *S. williamsii* NCYC106. 16: *S. williamsii* NCYC587. 20: *Hansenula anomala* ATCC36904. 21: *Hansenula anomala*. 22: *Hansenula anomala* ATCC2149. 23: *Hansenula anomala* IF00118. 24: *Brettanomyces anomalus* IF00796. 25: *Brettanomyces anomalus* IF00842. 26: *Brettanomyces anomalus* IF00642. 27: *Brettanomyces claussenii* ATCC10562. 28: *Candida utilis* IAN0628. 29: *Candida utilis* IF00619. 30: *Candida utilis* ATCC9256. 31: *Candida utilis* IF00839. 32: *Candida klusei* ATCC749. 33: *Candida ishiwadae* IF01495. 34: *Candida flareri* ATCC20278.

【図2】

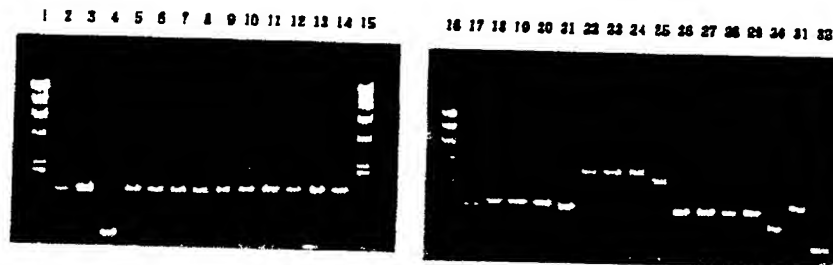


図2 rDNA PCR

1, 15, 16:  $\lambda$ -HindIII. 2, 3, 17: 下面酵母. 4: 上面酵母. 5: *S. ellipsoideus*. 6: *S. ellipsoideus* IF01950. 7: *S. ellipsoideus* IF00538. 8: *S. ellipsoideus* NCYC94. 9: *S. ellipsoideus* NCYC97. 10: *S. diastaticus* ATCC13007. 11: *S. diastaticus* IF01439. 12: *S. diastaticus* IF01444. 13: *S. diastaticus* IF01958. 14: *S. diastaticus* IF01015. 18: *Hansenula anomala* ATCC36904. 19: *Hansenula anomala*. 20: *Hansenula anomala* ATCC2149. 21: *Hansenula anomala* IF00118. 22: *Brettanomyces anomalus* IF00796. 23: *Brettanomyces anomalus* IF00842. 24: *Brettanomyces anomalus* IF00642. 25: *Brettanomyces claussenii* ATCC10562. 26: *Candida utilis* IAN0628. 27: *Candida utilis* IF00619. 28: *Candida utilis* ATCC9256. 29: *Candida utilis* IF00839. 30: *Candida klusei* ATCC749. 31: *Candida ishiwadae* IF01495. 32: *Candida flareri* ATCC20278.

【図3】

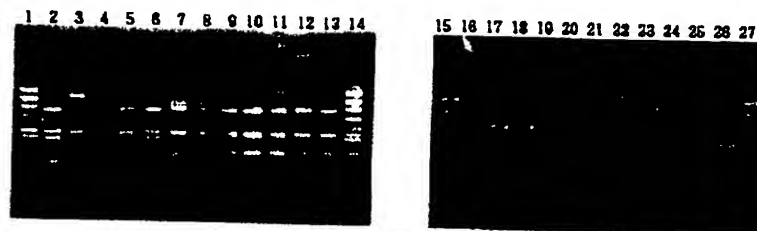


図3 rDNA MspI 切断パターン

1, 14, 15, 27:  $\phi$  X174-HindIII. 2: *S. bayanus* ATCC12752. 3: *S. bayanus* IF00539. 4: *S. bayanus* IF00613. 5: *S. bayanus* IF00676. 6: *S. bayanus* IF01127. 7: *S. legos* ATCC10603. 8: *S. legos* IF01229. 9: *S. legos* NCYC100. 10: *S. williamsii* IF00248. 11: *S. williamsii* IF00814. 12: *S. williamsii* NCYC106. 13: *S. williamsii* NCYC587. 16: 上面酵母. 17, 18: 下面酵母. 19: *Hansenula anomala* ATCC36904. 20: *Hansenula anomala*. 21: *Hansenula anomala* ATCC2149. 22: *Hansenula anomala* IF00118. 23: *Candida utilis* IAN0628. 24: *Candida utilis* IF00619. 25: *Candida utilis* ATCC9256. 26: *Candida utilis* IF00839.

【図 4】

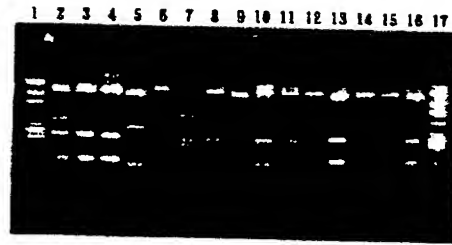


図 4 rDNA ScrfI 切断パターン

1, 17:  $\phi$  X174-HindIII, 2: 上面酵母, 3, 4: 下面酵母, 5: *S. bayanus* ATCC12752, 6: *S. bayanus* IF00539, 7: *S. bayanus* IF00613, 8: *S. bayanus* IF00676, 9: *S. bayanus* IF01127, 10: *S. bayanus* ATCC10603, 11: *S. bayanus* IF01226, 12: *S. bayanus* NCYC190, 13: *S. williamsii* IF00243, 14: *S. williamsii* IF00614, 15: *S. williamsii* NCYC108, 16: *S. williamsii* NCYC507 *S. bayanus* ABYC976

---

フロントページの続き

(72) 発明者 船橋 互

東京都大田区大森北 2-13-1 アサヒビ  
ール株式会社酒類研究所内